

贵州省化学化工学会团体标准

《酒醅中淀粉的测定》

编制说明

一、任务来源

贵州省生物技术研究开发基地有限公司在白酒酿造研发中发现酒醅中淀粉的含量是指导生产的重要指标，目前没有合适的方法进行快速可靠检测，向贵州省分析测试研究院、贵州省检测技术研究应用中心、贵州省科晖检验检测研究院有限公司提出检测方法需求，经调研酒企，同样存在生产过程中检测酒醅中淀粉的需求。经商议由贵州省分析测试研究院、贵州省生物技术研究开发基地有限公司、贵州省检测技术研究应用中心、贵州省科晖检验检测研究院等研制酒醅中淀粉的测定方法，基于之前的研究，提出团体标准项目申请，由贵州省化学化工学会技术归口。

二、标准的技术基础

团队进行了湿酒醅试样的化学法与双酶法进行对比，一方面，由于样品是未烘干样，虽然取样于同一个批次的样品，可能存在含水量不同的情况，在计算淀粉含量时，样品的重量可能存在不一致；另一方面，化学法水解淀粉的过程是剧烈反应，而双酶法的反应是温和的，酒醅样品中若含有种皮的硬度较大，且未进行破壁处理的情况下，淀粉酶无法接触到淀粉则不能进行水解；以上两种情况都有可能导致酶水解酒醅样品与化学法水解淀粉的含量相差较大。因此，使用酶水解淀粉时，先烘干样品，并进行磨匀处理，在进行酶水解。

进行了干样酒醅淀粉酶 pH 的优化、淀粉酶水解酶时间的优化、糖化酶 pH 的优化、糖化酶水解酶时间的优化、糖化酶浓度的优化、糖化酶添加量的优化；筛选出了最佳的淀粉酶与糖化酶的水解条件，并对此方法的精密度、重复性、加样回收进行验证，RSD 均在 5%以内。对比了 21 个批次的化学法与双酶法的水解淀粉含量的对比，两种方法的淀粉含量 RSD 均在 2%以内；说明此方法可以运用在酒醅中淀粉的测定。

三、制订标准的意义

贵州省是中国酱香型白酒的核心产区，2023 年，贵州省白酒总产能约 80 万千升，其中酱香型白酒产能 60 万千升，约占全国酱香型白酒总产能的 80%。贵州酱香型白酒采用独特的“12987”酿造工艺，即一年生产周期、两次投料、九次蒸煮、八次发酵、七次取酒，这种工艺确保了酱香型白酒的高品质。固态发酵是白酒酿造的重要工艺，酒醅是酿酒过程中的关键中

间产物，指的是在发酵阶段形成的、包含酵母、糖分及其他化合物的混合物。经酶及微生物的共同作用，酒醅中的淀粉缓慢地水解为葡萄糖，再经微生物代谢转化成乙醇和一些呈香呈味物质。因此，酒醅在酒类生产中起着重要作用，影响最终产品的风味、香气和质量等。

在发酵过程中，酒醅淀粉检测是评估生产过程中出酒率，控制生产成本的重要指标之一。因此，亟需制定适用于酱香型白酒生产的酒醅淀粉检测标准，以确保检测结果的准确性和可靠性，从而更好地指导生产实践，提升产品质量。

目前，酱香型酒醅需经过多轮次、多批次添加酒曲与原料进行轮次发酵，促使淀粉近乎完全转变成为还原糖；若在发酵阶段，通过对酒醅淀粉的含量进行把控，实现淀粉向还原糖的高效转化，进而提高白酒的品质、出酒率以及缩短发酵时间。

四、牵头起草单位简介

1. 起草单位 1: 贵州省分析测试研究院

贵州省分析测试研究院（以下简称“测试院”）创建于 1935 年 9 月，是以现代分析测试应用技术研究为主的公益一类科研事业单位，“十三五”期间，测试院孵化了贵州省检测技术研究应用中心、食品安全与营养（贵州）信息科技有限公司、贵州健安德科技有限公司、贵州贵科大数据有限责任公司等一批企事业单位，建成了国家食品（云技术应用）质量监督检验中心、工信部第三批产业技术基础公共服务平台（省部共建）、食品安全云平台、GLP 大健康平台等科技创新平台。共获得化学品物理危险性鉴定机构、铁路运输危险货物鉴定资质等国家级资质 2 项，资质认定（CMA）、贵州省冶金有色金属产品质量监督检验站资质认定（CMA）、建设工程质量检测机构、贵州省司法鉴定中心、贵州省火灾物证鉴定中心、环境损害鉴定机构、贵州省公共安全与应急管理研究中心省级资质 7 项，是 2017 年检验检测行业质量提升行动（食品农产品）牵头单位，建有贵州省食品安全技术人才基地、贵州营养源检测与研究基地、贵阳医学院以及贵阳学院教学基地等。现有在编职工 99 人，其中博士 14 人（含在读博士），硕士 56 人。并有高级职称 32 人，中级职称 42 人。在编人员中，多人受聘国家专业标准化技术委员会和省标准化技术委员会。测试院长期致力于标准编制，已主持/参与制定国家标准、地方标准、行业标准等 100 余项，覆盖农产品质量安全、环境、材料化工等领域。

2. 起草单位 2: 贵州省生物技术研究开发基地有限公司

贵州省生物技术研究开发基地有限公司前身为贵州省生物技术研究开发基地，成立于 1985 年 3 月，隶属于贵州省科技厅，原为综合性的科研开发事业单位，2021 年 10 月，根据国家事业单位改革三年行动计划要求，改制为国有独资有限责任公司。省生物基地先后承担省级以上

科研项目近 50 项，获省级以上科技成果 5 项，研究和开发出产品 50 余个。

目前，省生物基地人才团队规模总人数为 162 人(含下属企业)，其中专业技术人员 70 人，高级职称 7 人，中级职称 10 人。博士 1 人，硕士 21 人，执业药师 6 人。拥有微生物、药学、化学、制药工程、食品、化妆品、检测、流程制造等人才团队。在白酒酿造方面开展了大量研究，形成了一些列成果，并与贵州大学酿酒学院等建立长期合作关系。全资子公司贵州科晖制药 2022 年通过国家高新技术企业备案，拥有国药准字药品生产批件 28 个，拥有省级企业技术中心，药物研究与开发技术水平处于省内领先地位。全资子公司贵州省科晖检验检测研究院有限公司于 2024 年落户于贵州科学城，注册资金 1000 万元，是具有独立法人资质的第三方专业检验检测服务公司，已通过检验检测机构 CMA 资质认证，是为推动技术成果转化、服务贵州特色产业建设的平台，公司拥有食品科学、分析化学、药学、微生物学、农学等领域硕士人才领衔的专业技术团队，拥有丰富的检验检测技术服务和产品项目研发经验，能为众多企业提供技术支持。省生物基地面向我省科技需求和国民经济主战场，重点围绕微生物领域技术创新及开放创新开展共性关键技术和工程化技术研究，致力于推动应用示范、成果转移转化及产业化，努力构建产、学、研、金、介、用全链条全要素融合的新型研发机构。为支撑引领我省相关产业发展而砥砺前行，为建设特色科技强省作出应有贡献。

3. 起草单位 3：贵州省检测技术研究应用中心

成立于 2011 年 8 月，是贵州科学院所属的正县级公益二类事业单位，拥有全国唯一以云技术应用为核心的国家食品质量监督检验中心。业务范围涵盖农产品、化学化工、环境、冶金、建筑工程、材料、生物医学、司法、文物、工艺美术品的检验检测。拥有专业技术和综合管理人才团队 271 人，其中研究生及以上学历 17 人，本科学历 185 人；高级以上职称 12 人，中级职称 76 人，专业技术人员占 85%。

建成农药检测、兽药检测、理化检测、微生物检测、元素检测等十余个专业实验室，面积达 30000 平方米。配有荧光定量 PCR 仪、液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪、液相色谱-串联质谱仪、气相色谱-串联质谱仪、离子色谱仪等大型仪器设备 70 余台（套）。获得国家级资质 10 个，国家食品（云技术应用）质量监督检验中心、食品复检机构、实验室认可资质、绿色食品产地环境定点检测机构、特殊食品评价鉴定机构、全国生态环保优质农业投入品评价技术机构、全国农产品包装标识评价技术中心、全国分析检测技术培训机构、全国分析检测技术考核基地、全国名特优新农产品营养品质评价鉴定机构。省级资质 4 个，检测技术研究应用中心、农产品质量安全检测机构、贵州省环境损害鉴定评估机构、贵州省司法鉴定机构。并通过 9

项管理体系认证，质量管理体系、环境管理体系、职业健康安全管理体系、信息安全管理体系、云服务信息安全管理体系、业务连续性管理体系、知识产权管理体系、诚信管理体系、售后服务管理体系。

五、标准制定原则

1. 遵循国家法律法规和方针政策

严格遵守国家的法律法规，如《中华人民共和国民法典》、《中华人民共和国食品安全法》、《中华人民共和国环境保护法》等。在相关国家法律法规和强制性标准的基础上编写的，标准中涉及的法律、法规和强制性国家标准需要严格按照相关规定要求开展。计量单位采用法定计量单位。格式，编制和表达方法，按国家标准 GB/T 1.1 的要求。与现行法律、法规和强制性标准无冲突，并认真贯彻国家的方针政策，确保标准的合法性和合规性。

2. 满足使用要求并兼顾社会综合效益

标准的制定应充分考虑使用要求，确保标准的实用性和可操作性。同时，还需要兼顾全社会的综合效益，平衡各方利益，以实现社会资源的优化配置。

3. 合理利用国家资源，推广先进技术成果

在标准制定过程中，应充分利用国家资源，包括人力、物力、财力等，以推动标准的制定和实施。同时，应积极推广先进的技术成果，提高标准的科技含量和水平。

4. 保持标准之间的协调配套

与相关标准之间保持协调配套，避免出现矛盾和冲突。形成一个统一、完整的标准体系，提高标准的整体效能。

5. 保障社会安全和人民身体健康

有利于保障社会安全和人民身体健康，注重其安全性和可靠性。

六、主要工作过程（该部分在提交发布稿的时候修订完成）

1. 组织起草阶段

2025 年 1 月以来，团队收集相关资料，收集样品，开展方法检测研究。2025 年 5 月起草了标准草案。2025 年 7 月再次到酒企随机取样进行方法验证，经不同机构不同人员进行验证，结果一致性良好。

2. 征求意见阶段

。

3. 审查阶段

。

4. 报批阶段

。

七、确定标准主要技术内容及制定依据（所有技术要求制定的依据及其验证数据）

1. 主要技术内容

1.1 原理

在淀粉酶的作用下，糖苷键被水解，淀粉逐渐被分解为更小的分子，经过进一步水解后，最终产物是葡萄糖。DNS试剂中的3,5-二硝基水杨酸在碱性条件下可以与还原糖反应，生成3-氨基-5-硝基水杨酸（3-amino-5-nitrosalicylic acid），该物质呈现红棕色在540 nm波长下具有强烈的吸光性。还原糖中的醛基（-CHO）在反应中被氧化为羧基（-COOH），而DNS则被还原为3-氨基-5-硝基水杨酸。在540nm波长处测定吸光度与标准系列比较定量。

1.2 试剂和材料

1.2.1 淀粉酶（CAS号：9000-90-2）。

1.2.2 糖化酶（CAS号：9032-08-0）。

1.2.3 氢氧化钠（NaOH，CAS号：1310-73-2）。

1.2.4 盐酸（HCl，CAS号7647-01-0）

1.2.5 葡萄糖标准品（ $C_6H_{12}O_6$ ，CAS号50-99-7），纯度 $\geq 99.0\%$ 。

1.3 仪器设备

1.3.1 分光光度计，配有1cm比色皿。

1.3.2 分析天平，感量为0.01 g和0.0001 g。

1.3.3 离心机，10000 r/min。

1.3.4 研磨机。

1.3.5 恒温干燥箱。

1.3.6 水浴锅

1.3.7 pH计：精度为0.01

1.4 操作步骤

1.4.1 样品制备

取酒醅样，放置烘箱中40~65℃烘干至恒重，打磨至细粉，过40~80目筛子，备用。

1.4.2 测试液的制备

1.4.2.1 取0.1g试样于10mL试管中，加3-5mL纯化水沸水浴15~20min，冷却至室温。

1.4.2.2 用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节pH至4.5~5。

1.4.2.3 加入淀粉酶溶液(4.2.1)5~10mL，60℃水浴40分钟-60分钟，过滤，用纯化水补水至50mL；另取一支10mL试管，取上述淀粉酶溶液酶解液1mL加入糖化酶溶液(4.2.2)1mL 60℃水浴30分钟，用纯化水补水至10mL，备用，同时做空白试剂。

1.4.3 标准曲线的制作

1.4.3.1 准确吸取葡萄糖标准溶液(4.2.5)0.0mL, 0.05mL, 0.1 mL, 0.15 mL, 0.2 mL, 0.25 mL, 0.3 mL, 分别置于 15 mL 比色管中, 分别补水至 1mL, 加 2mL DNS 混匀, 沸水浴 5min, 冷却至室温, 加 9 mL 纯化水, 混匀。

1.4.3.2 配制成浓度为 0.0mg/mL, 0.05mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.3 mg/mL 的标准溶液系列, 以零管作参比, 在 540nm 处, 测定其吸光度值。

1.4.3.3 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.4.4 试样溶液的测定

吸取 1 mL 待测液于 15 mL 比色管中, 加 2mL DNS 混匀, 沸水浴 5min, 冷却至室温, 加 9 mL 纯化水, 混匀。在 540nm 处, 测定其吸光度值。根据 1.4.3.3 标准曲线计算含量。

1.5 结果计算

按公式(1)计算:

$$X = \frac{(C-C_0) \cdot V \cdot n}{m} \cdot 0.9 \cdot 100 \tag{1}$$

式中:

X—样品中淀粉含量, 单位为%;

C—测定试样溶液中葡萄糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

C0—测定空白溶液中葡萄糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

V—提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

n—稀释倍数;

m—样品的质量, 单位为毫克 (mg);

0.9—淀粉与还原糖转换系数;

100—百分数;

计算结果保留到小数点后两位。

1.6 精密度

在重复性条件下两次独立测定结果绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

2. 制定依据

依据 GB/T 1.1-2020 及 GB/T20001.4 标准编写规则 第 4 部分 化学分析方法制定。

3. 技术指标验证

进行了干样酒醅淀粉酶 pH 的优化、淀粉酶水解酶时间的优化、糖化酶 pH 的优化、糖化酶水解酶时间的优化、糖化酶浓度的优化、糖化酶添加量的优化; 筛选出了最佳的淀粉酶与糖化酶的水解条件, 并对此方法的精密度、重复性、加样回收进行验证, RSD 均在 5%以内。对比了 21 个批次的化学法与双酶法的水解淀粉含量的对比, 两种方法的淀粉含量 RSD 均在 2%以内; 说明此方法可以运用在酒醅中淀粉的测定。

2025 年 7 月, 随机抽取样品在不同实验室验证, 检测结果一致性良好。

样品	淀粉含量	淀粉含量	淀粉含量	淀粉含量
C	28.32%	26.70%	26.95%	26.23%
金窖	24.58%	30.60%	25.16%	24.29%
酱酒	42.63%	41.60%	41.52%	41.47%

八、标准推广应用的预期效果

可更好指导我省酱酒生产，提升产品质量，有利于保护消费者权益。

团标编制小组

2025 年 10 月



淀粉双酶法研究验证

- (1)取刚出窖/入窖的酒醅样，放置烘箱中 40-65℃烘干至恒重，打磨至细粉，过 40-80 目筛子
- (2)取样：取 0.1g 试样，加 3-5mL 纯化水沸水浴 15-20min，冷却至室温
- (3)调节 pH 至 4.5-5
- (4)加入淀粉酶溶液 5-10mL，60℃水浴 40 分钟-60 分钟，过滤，用纯化水定容至 50mL。
- (5)取上述淀粉酶酶解液 1mL 加入糖化酶溶液 1mL 60℃水浴 30 分钟，用纯化水定容至 10mL。
- (6)测定：取 1mL 水解样品加 2mLDNS 沸水浴 5min，冷却至室温，加 9 mL 纯化水，混匀，在紫外分光光度计以 540nm 测定其 OD 值。
- (7)标准曲线的绘制

配制 1mg/mL 的葡萄糖标准液：量取 0.1g（精确到 0.1000g）经过 105℃烘干的葡萄糖，溶于 100mL 纯化水，混匀。取 0.00mL、0.05mL、0.1mL、0.15mL、0.2mL、0.25mL、0.3mL 葡萄糖标准液，分别置于 15mL 具塞比色管中，补水至 1mL，分别加入 2mLDNS，沸水浴 5min,待冷却，加入 9mL 纯化水，用 1cm 比色杯，以零管调零，于波长 540nm 处测定其吸光值，绘制标准曲线。

表 1 化学法与双酶法水解淀粉含量对比

序号	样品名称	化学法	酶法	平均值	标准差	相对标准差
1	0803-2bq	68.61%	69.56%	69.08%	0.67%	0.98%
2	1108bh	49.12%	47.80%	48.46%	0.94%	1.93%
3	20231012bh	51.11%	52.76%	51.94%	1.17%	2.24%
4	0706-149d	59.44%	59.92%	59.68%	0.34%	0.57%
5	0606-229d	62.37%	62.77%	62.57%	0.28%	0.44%
6	1211-1mq	58.59%	57.80%	58.20%	0.56%	0.96%
7	1108bq	49.17%	49.57%	49.37%	0.29%	0.58%
8	0706-335d	61.49%	62.55%	62.02%	0.75%	1.21%
9	1226-1zq	58.58%	60.14%	59.36%	1.10%	1.86%
10	1220-2bh	64.61%	67.26%	65.93%	1.87%	2.84%
11	1012mq	51.94%	51.28%	51.61%	0.47%	0.90%
12	20231211-2zq	45.17%	47.78%	46.47%	1.85%	3.97%
13	20231226-2zh	57.02%	57.82%	57.42%	0.56%	0.98%
14	20240130rq	55.86%	52.27%	54.07%	2.54%	4.69%
15	20231108	51.53%	50.72%	51.12%	0.58%	1.13%
16	0706 -150d	57.73%	62.87%	60.30%	3.64%	6.03%
17	20231012bh	51.77%	51.46%	51.61%	0.22%	0.42%
18	1211-1zh	57.44%	57.11%	57.28%	0.23%	0.41%
19	20231211-2zq	45.17%	47.78%	46.47%	1.85%	3.97%
20	20240129bh	51.77%	50.72%	51.24%	0.74%	1.45%
21	20231226-2zh	57.02%	57.82%	57.42%	0.56%	0.98%

22	20231108	51.53%	50.72%	51.12%	0.58%	1.13%
23	20240130rq	55.86%	52.27%	54.07%	2.54%	4.69%
24	20231012bh	51.77%	51.46%	51.61%	0.22%	0.42%
25	20231226-1zq	58.58%	60.14%	59.36%	1.10%	1.86%
26	0831-2zh	43.36%	43.03%	43.20%	0.23%	0.53%
27	0706 -150d	57.73%	62.87%	60.30%	3.64%	6.03%

（一）、湿酒醅

1、化学法：取酒醅样品 5g，加入 100mL 1:4 HCl，插入直型冷凝管，置于电炉上微沸水解 30min，取出，迅速用自来水冷却至室温，用滤纸过滤，定容至 250 mL，取 1 mL 补水至 10 mL，得待测液。

2、酶解法

(1)取样：取酒醅样品5g，加入30 mL纯化沸水浴15min，冷却至室温

(2)调节pH至5

(3)加入1%淀粉酶溶液50mL，60℃水浴40分钟-60分钟，过滤，用纯化水定容至250mL

(4)取上述淀粉酶酶解液1mL加入0.25%糖化酶溶液1mL 60℃水浴30分钟，用纯化水定容至10mL。

(5)使用DNS显色剂做显色反应，使用紫外分光光度计或酶标仪在540nm处测定吸光值

(6)标准曲线

配制 1mg/mL 的葡萄糖的母液，分别取 1mg/mL 的葡萄糖的母液 0.1mL、0.2 mL、0.4mL、0.6mL、0.8 mL、1.6 mL，分别补水至 2mL，加 2mLDNS 沸水浴 5min，冷却至室温，补水至 25mL，混匀，在紫外分光光度计以 540nm 测定其 OD 值。

结果如表 2 所示，计算得出线性回归方程 $y=1.11267*x-0.00989$ ，相关系数 $R^2=0.9959$ 。

表 2 标准曲线 OD 值

浓度（mg/mL）	OD
0.05	0.0319
0.1	0.0894
0.2	0.2245
0.4	0.4726
0.6	0.6409
0.8	0.8736

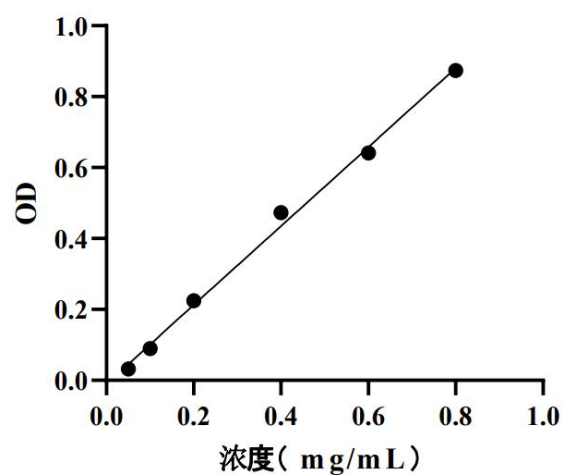


图 1 湿样标准曲线

3、计算公式

计算公式：

$$X = \frac{C \cdot V \cdot n}{m} \cdot 0.9 \cdot 100$$

式中：

C：标准曲线查的糖量，单位为毫克每毫升（mg/mL）

V：提取液的体积，单位为毫升（mL）

n：稀释倍数

m：样品的质量，单位为毫克（mg）

0.9：淀粉与还原糖转换系数

100：百分数

表 3 湿样化学法与酶法淀粉含量对比

序号	样品名称	化学法	双酶法	平均值	RSD
1	1220-1 蒸前	22.80%	28.31%	25.56%	15.25%
2	0803-2 拌前	39.34%	36.16%	37.75%	5.97%
3	1012 拌后	27.91%	25.16%	26.53%	7.31%
4	1012 拌前	32.13%	27.36%	29.74%	11.34%
5	0606-2 29d	32.43%	28.58%	30.50%	8.92%
6	1211-1 拌前	30.27%	29.84%	30.06%	1.00%
7	1108 拌后	20.60%	19.27%	19.93%	4.73%
8	1226-1 蒸前	25.96%	27.70%	26.83%	4.61%
9	0712-2 封前	18.25%	14.17%	16.21%	17.81%
10	1211 蒸后	35.12%	25.41%	30.27%	22.68%
11	1108 补前	35.08%	19.86%	27.47%	39.17%
12	1108 补后	21.31%	18.07%	19.69%	11.64%

13	1211-2 拌前	18.52%	27.45%	22.99%	27.48%
14	0706-3 35d	30.56%	29.90%	30.23%	1.53%
15	0831-2 蒸前	28.25%	20.46%	24.36%	22.62%
16	1211-1 拌后	23.10%	31.00%	27.05%	20.65%
17	1226-2 蒸后	17.24%	26.43%	21.83%	29.78%
18	0511-1 入前	27.23%	31.64%	29.43%	10.60%
19	1211-2 封前	27.85%	27.88%	27.87%	0.09%
20	1226-1 蒸后	23.14%	23.26%	23.20%	0.36%
21	0706-149d	27.70%	29.35%	28.53%	4.08%
22	0130-2	20.50%	15.73%	18.12%	18.61%

本试验以地方标准 DB34/T2264-2014 与两步双酶法水解酱香型酒醅淀粉，一共选取了 22 批不同发酵批次的酱香型酒醅，其中，样品 1211-2 封前化学法淀粉含量为 27.85%，酶解法淀粉含量为 27.88%，RSD 值为 0.09%；1108 补前化学法淀粉含量为 35.08%，酶解法淀粉含量为 19.86%%，RSD 值为 39.17%。

出现以上现象，可能有以下的原因：由于样品是未烘干样，虽然取样于同一个批次的样品，可能存在含水量不同的情况，在计算淀粉含量时，样品的重量可能存在不一致，导致使用酶水解酒醅样品与化学法水解淀粉的含量相差较大。因此，使用酶水解淀粉时，先烘干样品在进行酶水解。

（二）、干酒醅

1、化学法

称取烘干入池酒醅样过 40 目筛 5 g (准确至 0.01 g)，置于 250 mL 三角瓶中，加入盐酸溶液 100 mL，插入直形冷凝管(约 1m)，置电炉上微沸水解 30 min，取出，迅速用自来水冷却至室温，用氢氧化钠溶液中和至微酸性，用定性滤纸或脱脂棉过滤于 500mL 容量瓶中，并用水充分洗涤残渣，洗液并入容量瓶中，定容，摇匀，得待测液。

2、酶解法：

(1)淀粉酶pH值优化：

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，冷却至室温，调节不同 pH，设置了 pH 从 4、4.5、5、5.5、6、6.5、7，确定淀粉酶最适 pH；添加 1%淀粉酶 10mL，放置 60℃水浴 1h，水解结束，定容至 50mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，分析淀粉酶最适 pH，结果如图 1 所示。

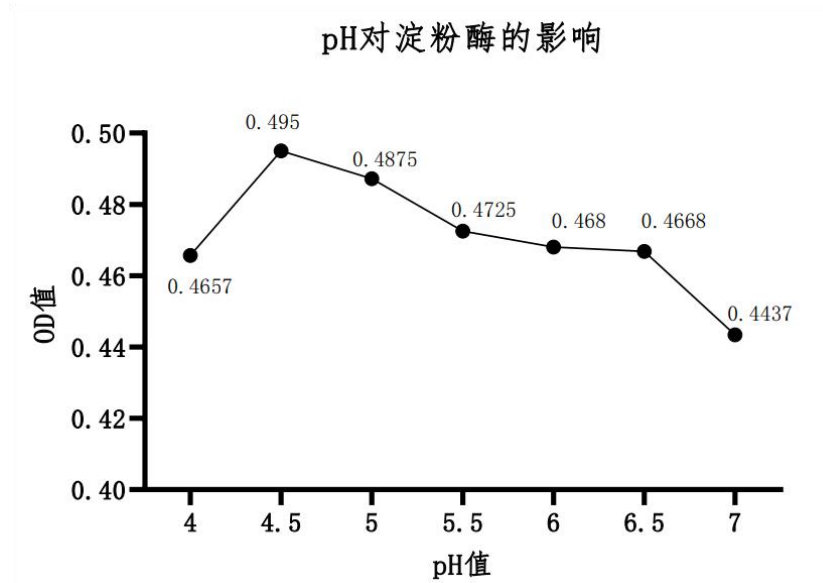


图 2: pH 对淀粉酶的影响

由图 2 可得，随着 pH 值的升高，OD 值上升再下降，淀粉酶的活性先升高在逐渐降低。当 pH 为 4.5 时，淀粉酶的活性达到最大值。因此，淀粉酶的最适 pH 为 4.5。

(2)淀粉酶时间优化

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，添加 1%淀粉酶 10mL，60°C水浴锅中放置不同时间，设置了水解时间从 30min、40min、50min、60min、70min，分析淀粉酶水解的最佳时间，水解结束，定容至 50mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，确定淀粉酶水解的最佳时间，结果如图 3 所示；

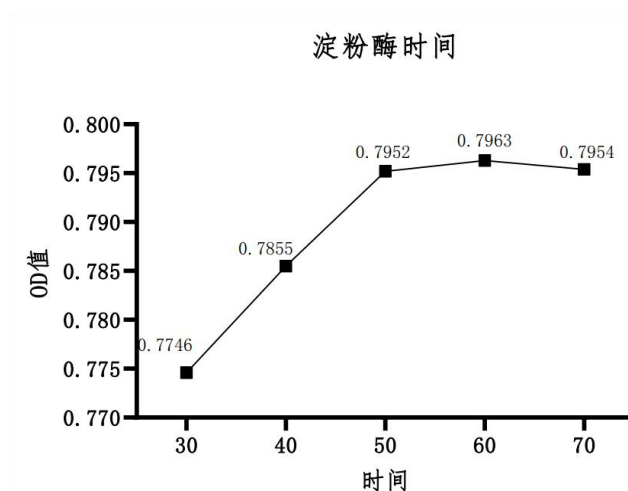


图 3: 淀粉酶时间

由图 3 可知，淀粉酶水解时间从 30min 至 50min 之间，OD 值持续上升，因此可得，随着水解时间增加，水解程度逐渐上升；水解时间为 50min 时，达到最大值，继续延长水解时间，OD 值保持恒定不

变。因此，淀粉酶的水解时间为 50min。

(3)糖化酶pH值优化

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，添加 1%淀粉酶 10mL，60℃水浴锅中放置 50min，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL0.25%糖化酶，设置了 pH 为 4、4.2、4.4、4.6、4.8、5，确定糖化酶最适 pH，60℃水浴锅中放置 30min，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量；如图 4 所示；

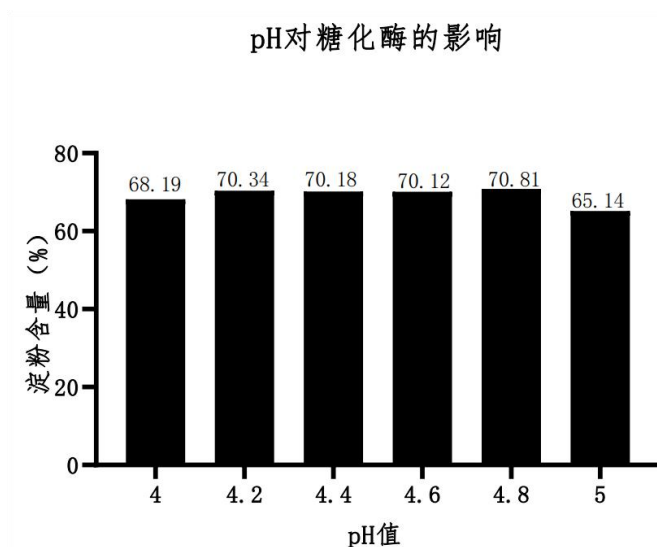


图 4： pH 值对糖化酶的影响

由图 4 可知，pH4-5 之间对糖化酶水解淀粉的含量影响不显著，因此，在使用糖化酶水解淀粉时，保持 pH 在 4-5 之间即可；由于淀粉酶最佳 pH 为 4.5-4.6，糖化酶最佳 pH 为 4-5，因此，糖化酶水解时不需要调节 pH。

(4)糖化酶浓度与淀粉含量的关系

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，60℃水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL 不同浓度的糖化酶，60℃水浴锅中放置 30min，分析不同浓度的糖化酶水解淀粉含量的程度，设置糖化酶浓度为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%，确定糖化酶最适浓度，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量；结果如图 5 所示；

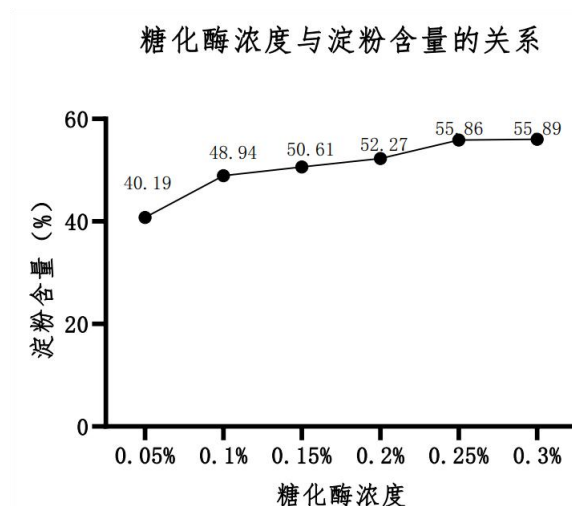


图 5：糖化酶浓度与淀粉含量的关系

由图 5 可知，随着糖化酶浓度的增加，淀粉含量也逐渐升高，当糖化酶浓度达到 0.25% 时，淀粉含量不再升高，因此，糖化酶最适浓度为 0.25%。

(5) 糖化酶添加量与淀粉含量的关系

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，60℃ 水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加不同含量的 2.5% 糖化酶，60℃ 水浴锅中放置 30min，设置了添加量为 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.9 mL、1 mL，确定糖化酶最适添加量，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量 (%) = 葡萄糖浓度 * 稀释倍数 * 0.9 / 称取样品重量；结果如图 6 所示；

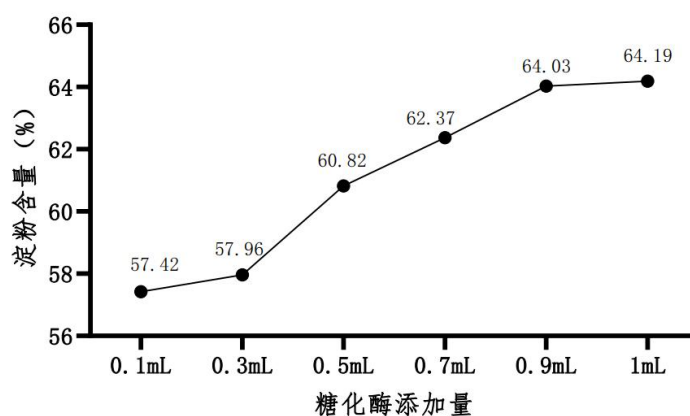


图 6：糖化酶添加量与淀粉含量的关系

以水解 30min 为基底，设置不同梯度的添加量，由图 6 可知，随着糖化酶添加的量逐渐增加，淀粉含量也逐渐升高；当糖化酶添加量为 0.9mL 时，淀粉含量达到最大值，继续添加糖化酶，淀粉含量不再增加，保持恒定不变，由此得出，淀粉酶的添加量为 0.9mL，在实际水解过程中，糖化酶添加量为 1mL，

以便后续的定容等。

(6)水解时间的优化

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，60℃水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL 0.25%糖化酶，60℃水浴锅中放置不同时间，设置水解时间为 30min、60min、90min、120min，确定最适水解时间，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值，从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量；结果如图 7 所示；

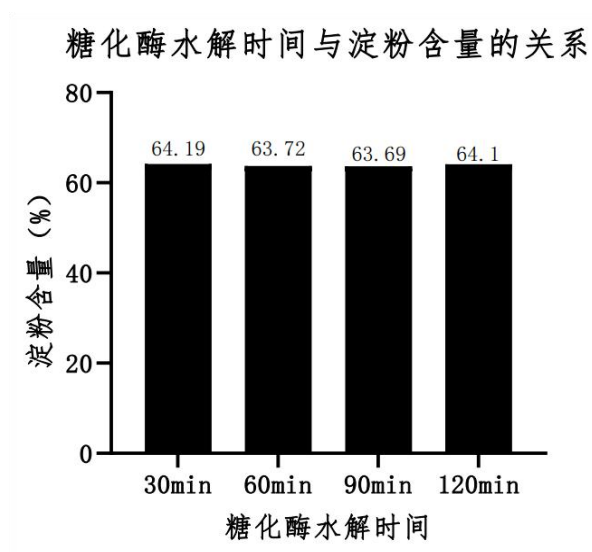


图 7：水解时间与淀粉含量的关系

由图 7 可得，随着糖化酶水解时间逐渐增加，淀粉含量几乎不变；因此，糖化酶水解时间为 30min。

(7)确定最适样品重量

本试验称取酒醅样品不同重量，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，加 1%淀粉酶 10 mL,60℃水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL 0.25%糖化酶，60℃水浴锅中放置 30min，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量；分析不同重量的样品酶法水解效果，结果如图 7 所示；

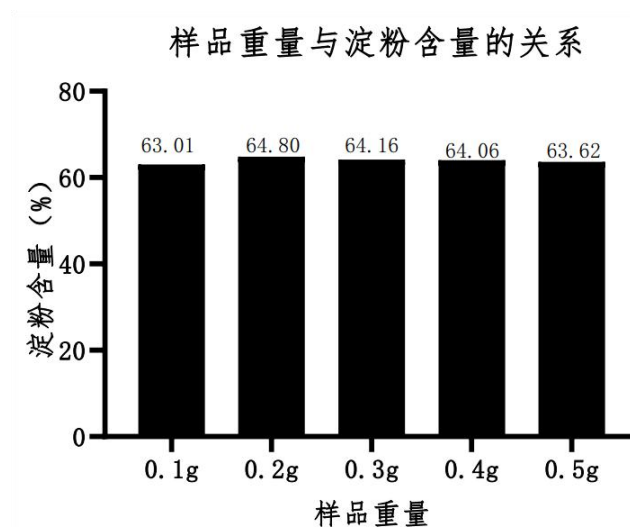


图 7：样品重量与淀粉含量的关系

由图 7 可得，称取样品 0.1g-0.5g，淀粉含量几乎不变，因此，本试验称取酒醅样品为 0.1g。

（8）标准曲线的绘制

配制 1mg/mL 的葡萄糖标准液：量取 0.1g（精确到 0.1000g）经过 105℃烘干的葡萄糖，溶于 100mL 纯化水，混匀。取 0.00mL、0.05mL、0.1mL、0.15mL、0.2mL、0.25mL、0.3mL 葡萄糖标准液，分别置于 15mL 具塞比色管中，补水至 1mL，分别加入 2mLDNS,沸水浴 5min,待冷却，加入 9mL 纯化水，用 1cm 比色杯，以零管调零，于波长 540nm 处测定其吸光值，绘制标准曲线。 $y = 1.39876x - 0.05956$ ， $R^2 = 0.9998$

表 4 标准曲线

浓度（mg/mL）	OD
0.05	0.0105
0.1	0.0817
0.15	0.1518
0.2	0.2162
0.25	0.2875
0.3	0.3637

（9）精密度的试验

以 0.15mg/mL 的葡萄糖溶液重复 6 个平行处理，检测仪器的精密度。

表 5 精密度试验

编号	OD	C	平均值	SD	RSD
----	----	---	-----	----	-----

1	0.1539	0.1526	0.1522	0.06%	0.38%
2	0.1531	0.1520			
3	0.154	0.1527			
4	0.1527	0.1517			
5	0.1542	0.1528			
6	0.1522	0.1514			

(10) 重复性试验

本试验称取酒醅样品 0.1g，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，加 1%淀粉酶 10 mL，60℃水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL 0.25%糖化酶，60℃水浴锅中放置 30min，水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量；

实验结果得出：6 个样品的平均含量为 59.1587%，RSD 为 1.37%。

表 6 重复性试验

编号	样品重量	OD	C	还原糖含量	平均值	SD	RSD
1	100.1	0.1257	0.1324	59.5411	59.1587	81.29%	1.37%
2	100.2	0.1253	0.1322	59.3533			
3	100.1	0.1208	0.1289	57.9663			
4	100.2	0.1277	0.1339	60.1238			
5	100.2	0.1223	0.1300	58.3900			
6	100.2	0.126	0.1327	59.5780			

(11) 加样回收

本试验以重复性实验还原糖的含量 59.1587%为加样回收总含量，设置了 3 个加样回收比例，分别为 1：80，1：100，1：120，每个比例进行 3 个重复；每个样品称取 0.05g(精确到 0.001)，分别加入按比例添加标准葡萄糖溶液，加入 3mL 水沸水浴 20min，调节 pH 值为 4.5-4.6，加 1%淀粉酶 10 mL，60℃水浴锅中放置 50min，水解结束后，定容至 50mL，取 1mL 淀粉酶酶解液加 1mL 0.25%糖化酶，60℃水浴锅中放置 30min，

水解结束，定容至 10mL，取 1 mL 酶解液加 2 mL DNS 沸水浴 5min，加 9mL 水，记录 OD 值从标准曲线读出葡萄糖浓度，计算淀粉含量，计算公式：淀粉含量（%）=葡萄糖浓度*稀释倍数*0.9/称取样品重量。

实验结果得出：1: 80 的回收比例为 98.90%，1:100 的回收比例为 104.81%，1:120 的回收比例为 101.69%。

表 7 加样回收试验

回收比例	样品称重	OD	C	样品总含量	样品中含量	回收率	平均值	SD	RSD
1: 80	0.0501	0.1051	0.1177	59.2817	32.9317	98.40%	98.90%	0.56%	0.57%
	0.0502	0.1061	0.1184	59.3475	32.9975	99.50%			
	0.0501	0.1054	0.1179	59.2817	32.9317	98.80%			
1:100	0.0501	0.1309	0.1362	65.8617	32.9317	106.74%	104.81%	2.57%	2.45%
	0.0503	0.1304	0.1358	65.9932	33.0632	105.80%			
	0.0503	0.1268	0.1332	65.9932	33.0632	101.89%			
	0.0502	0.1431	0.1449	72.4975	32.9975	99.86%			
1: 120	0.05	0.1471	0.1477	72.3660	32.8660	103.81%	101.69%	1.99%	1.96%
	0.0501	0.1446	0.1460	72.4317	32.9317	101.39%			